

# Superantígenos y neoplasias linfoides

Alejandra Duarte<sup>1</sup>, Isabel Piazzon.<sup>2</sup>

Pren. Méd. Argent.  
Agosto 2017  
Vol. 103 - N° 6  
321-330

Durante millones de años, huéspedes y patógenos han co-evolucionado desarrollando complejas interrelaciones. Los vertebrados adquirieron un sistema inmune que por lo general es capaz de defenderlo con éxito de las infecciones. Los patógenos a su vez han desarrollado estrategias para evadir la respuesta inmune.

Haremos una breve descripción de la forma en que estas células reconocen al antígeno convencional durante la respuesta inmune adaptativa, de modo de explicar a continuación las características peculiares del reconocimiento de las moléculas antigénicas denominadas superantígenos (Sags).

Los linfocitos T y B son las células efectoras centrales de la respuesta inmune adaptativa. Los receptores que participan en el reconocimiento antigénico son diferentes según se trate de linfocitos B o T.

Los linfocitos B productores de anticuerpos reconocen al antígeno en forma soluble a través de las inmunoglobulinas de superficie (receptor de los linfocitos B, BCR) que luego serán secretadas por estas células. Por su parte los linfocitos T colaboran con las células B para que estas cumplan su función (T CD4) y ejercen funciones citotóxicas sobre células infectadas por patógenos o que expresan antígenos extraños (T CD8). El receptor de las células T (TCR) posee dos cadenas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  y reconoce al antígeno expresado en la superficie de células denominadas presentadoras de antígenos (CPA). Las CPA- entre las que se encuentran las células dendríticas, los monocitos y hasta los mismos linfocitos B- luego de proce-

sar al antígeno lo exponen en su superficie asociado a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Este complejo MHC-péptido antigénico es el reconocido por las células T.

Los receptores de los linfocitos B y T presentan regiones constantes (C) y variables (V).

En el caso de las células T, los antígenos convencionales asociados al MHC son reconocidos por todos los elementos variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  ( $V\alpha$ ,  $J\alpha$ ,  $V\beta$ ,  $D\beta$ ,  $J\beta$ ) (Figura 1). Los linfocitos T CD4 reconocen al péptido antigénico procesado y presentado por las células presentadoras de antígenos asociados a moléculas MHC de clase II; las células T CD8 reconocen al péptido asociado a moléculas MHC de clase I.

Las células B reconocen a los antígenos convencionales sin procesar y en forma soluble utilizando todas las regiones variables del BCR. Tanto las inmunoglobulinas solubles como las que integran el BCR están formadas por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L). Ambas cadenas poseen regiones constantes (C) y variables (V). Dentro de las regiones variables existen segmentos hipervariables que conforman la denominada región determinante de complementariedad (CDR) que es la que participa en el reconocimiento de los antígenos convencionales (Figura 2).

El hecho de que la combinación de todas las regiones variables de los receptores B y T participan en el reconocimiento del antígeno determina que la frecuencia de los linfocitos que reconocen a un antígeno determinado sea muy baja. Por ejemplo, el resultado del reconocimiento de un antígeno convencio-

1 Investigadora Asistente del CONICET.

2 Investigadora Principal del CONICET y Jefa del Laboratorio de Inmunología Experimental del Instituto de Medicina Experimental del CONICET-Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

nal por parte de las regiones V de ambas cadenas del receptor de los linfocitos T es una respuesta clonal en la cual menos del 0.1% de las células T vírgenes se activan y proliferan.

Algunos de los clones T que han reconocido al antígeno mueren pero otros persisten como linfocitos T de memoria, lo que permite una respuesta más vigorosa y rápida ante el futuro encuentro con el mismo antígeno. Por su parte, el encuentro del antígeno con la todas las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas del receptor B (CDR), determina la activación de dichas células B. Luego de presentar al antígeno a las células T CD4<sup>+</sup> (colaboradoras), se transforman en células plasmáticas que sintetizan inmunoglobulinas específicas para el antígeno. A pesar de que la síntesis de anticuerpos y el cambio de clase de las inmunoglobulinas (por ej de IgM a IgG) puede producirse independientemente de la interacción con los linfocitos T CD4, esta señalización juega un rol de importancia en dicho cambio de clase. Si bien algunos de los clones B reactivos mueren, muchas de estas células persisten como células de memoria las que como las células T montarán una rápida respuesta frente a un nuevo encuentro con el mismo antígeno.

### Superantígenos

En contraposición a lo descripto para los antígenos convencionales, algunas proteínas antigénicas de origen bacteriano o viral denominadas superantígenos (Sags) interactúan sólo con regiones constantes que se encuentran dentro de las regiones variables de los TCR y BCR (ver Figuras 1 y 2) y no requieren procesamiento antigénico. La interacción de los Sags con los linfocitos B y T induce una intensa activación que lleva a la muerte por apoptosis de la mayoría de estas células.

La apoptosis o muerte celular programada es una forma altamente regulada de muerte celular que controla la ho-

meostasis. Este tipo de muerte celular ocurre a lo largo de la vida del individuo comenzando durante el desarrollo embrionario. Las células que entran en este proceso son fagocitadas por otras células, principalmente por macrófagos. La característica más importante de la muerte por apoptosis es la de no producir inflamación. Los mecanismos moleculares de la apoptosis son sumamente complejos y como veremos más adelante intervienen en ellos numerosas proteínas que están implicadas en su regulación.

### Superantígenos T y B.

Los Sags T descriptos hasta el momento son reconocidos solo por células T CD4. A diferencia de los antígenos convencionales no requieren de procesamiento previo a la presentación por las moléculas de MHC de clase II expresadas por las células presentadoras y se unen a dichas moléculas en sitios diferentes al hueco en el que se presenta el antígeno convencional (ver Figura 1). Los complejos así formados interactúan sólo con sitios constantes que se encuentran dentro de la región variable de la cadena  $\beta$  ( $V\beta$ ) del receptor T (TCR). Estos sitios de interacción se ubican fuera del sitio de reconocimiento del antígeno convencional. Dado que existe un número limitado de cadenas  $V\beta$ , la interacción de un determinado Sag con el TCR activa un gran número de células T (cerca del 20% de las células T totales).

Los Sags T de origen bacteriano mejor estudiados son los de la familia de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* (SEA, SEB, SEI, TSST-1, SEE, entre otros) y de *Streptococcus pyogenes* (SSA). También se encontraron Sags asociados a pseudomonas, a *Mycobacterium tuberculosis*, a *Toxoplasma gondii* y a *Mycoplasma arthritidis*. Entre los virus que producen Sags T se encuentra el virus del tumor mamario murino (MMTV), que es un retrovirus tipo B, el virus de la rabia y herpes virus como el citomegalovirus.



La capacidad de ciertos Sags bacterianos y virales para interactuar con diferentes clones de células T normales que expresan determinadas cadenas V $\beta$  independientemente de la cadena  $\alpha$  expresada ha sido ampliamente estudiada. Por ejemplo, en el ratón, las enterotoxinas estafilocócicas SEA y SEE interactúan con los receptores de células T que expresan regiones V $\beta$ 3, 7 y 17. En humanos SEE interactúa con células T que expresan V $\beta$ 8. Hemos descrito diferentes variantes de MMTVs exógenas, denominadas MMTV BALB14, MMTV BALB2 y MMTV BALB6. La primera codifica para un Sag que es reconocido específicamente por células T murinas que expresan la región V $\beta$ 14; la segunda codifica un Sag que es reconocido por las células T V $\beta$ 2 y la tercera por células V $\beta$ 6 y V $\beta$ 2 8.1+.

Por su parte los Sags B -que han sido menos caracterizados- interactúan con regiones constantes de los dominios variables de las cadenas pesadas o livianas del BCR que no involucran los loops determinantes de la complementariedad (CDRs) siendo así capaces de estimular a un alto número de linfocitos B (5-50%) (Figura 2). Un prototipo de Sag B es la proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA), la cual interacciona con inmunoglobulinas cuya cadena pesada (H) está codificada por los genes de la familia VH3 en humanos y por genes pertenecientes al clan VH III en ratón. Otro Sag B es la proteína L de *Peptostreptococcus magnus* (PpL), que interactúa con la cadena liviana  $\kappa$  del BCR y que en humanos está restringida a los productos de los genes V $\kappa$ 1, V $\kappa$ 3 y V $\kappa$ 4. Finalmente se ha descrito que la glicoproteína gp120 del HIV también posee propiedades superantigénicas sobre células B.

### Superantígenos y linfomas/leucemias.

Como hemos señalado, la interacción de los Sags con los linfocitos T y B causa en los mismos una fuerte estimulación que induce la muerte por apopto-

sis de las células que los reconocen. Estos efectos han sido descritos solo para linfocitos T y B normales. En cuanto a su uso experimental sobre neoplasias sólo fueron utilizados hasta el momento algunos Sags T para aumentar la inmunogenicidad de células tumorales, por ejemplo fusionando enterotoxinas de *Staphylococcus* (SEA o SEB) con la región Fab de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos tumorales. Sin embargo, hasta el momento no se había investigado si la interacción de los Sags con células de neoplasias T o B a través de los receptores TCR o BCR causaba su muerte por apoptosis.

Es sabido que las células tumorales presentan alteraciones en una variedad de mecanismos moleculares que aumentan su resistencia a la apoptosis. Esta desactivación de las respuestas apoptóticas es fundamental para el desarrollo del cáncer y podría contribuir además a la resistencia al tratamiento. Sin embargo, como detallaremos a continuación, en nuestro laboratorio hemos demostrado que los SAgS son capaces de inducir la apoptosis de diversos linfomas/leucemias T y B tanto murinas como humanas que presentan distintas alteraciones en los mecanismos que intervienen en la apoptosis. No existen antecedentes bibliográficos de este efecto de los Sags sobre neoplasias linfoides.

### Superantígenos T y linfomas/leucemias T murinos

Utilizamos diferentes linfomas que surgen espontáneamente en la cepa de ratones AKR/J. En primer lugar determinamos la expresión y la especificidad de la cadena V $\beta$  de cada uno de ellos (por ej V $\beta$ 2,5, 6, 8, etc). De 38 linfomas estudiados, el 74% expresaba TCR. Se utilizaron distintos Sags que interactúan específicamente con cada uno de estos linfomas -según la región V $\beta$  expresada por los mismos- y como control Sags que no interaccionaran con el receptor expresado.

Mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* determinamos que los Sags específicos eran capaces de inducir la apoptosis en un alto porcentaje de las células T neoplásicas en todos los linfomas estudiados.

Existen dos vías principales involucradas en la muerte celular por apoptosis. Una de ellas, denominada vía extrínseca actúa a través de la interacción de diferentes moléculas con receptores denominados de muerte como por ej el receptor 1 para el factor de necrosis tumoral (TNFR1), o el receptor Fas. La segunda, denominada intrínseca, depende de la participación de las mitocondrias. Los miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia de moléculas Bcl-2 regulan centralmente esta última vía. En ambas vías de apoptosis intervienen diferentes caspasas. Por ej la caspasa 8 interviene en la vía extrínseca y la caspasa 9 en la intrínseca. Finalmente existen caspasas efectoras comunes a ambas vías que una vez activadas median la fase final que lleva a la muerte celular (Figura 3).

Determinamos que en la mayoría de los linfomas murinos estudiados la expresión de Bcl-2 no estaba alterada mientras que en todos ellos la expresión de Fas estaba marcadamente disminuida. La exposición a Sags no indujo alteraciones detectables en la expresión de Bcl-2. Sin embargo logró revertir la baja expresión de Fas observada en estos linfomas. El aumento en la expresión de Fas se pudo detectar tanto *in vivo* como *in vitro*.

Este resultado nos llevó a investigar en primer lugar el efecto de los Sags en la apoptosis mediada por la vía extrínseca. La exposición de las células neoplásicas a Sags no solamente indujo aumentos en la expresión de Fas sino que la inhibición de la señalización a través de este receptor de muerte o la inhibición de la caspasa 8 disminuyeron significativamente la inducción de apoptosis por los Sags. Estos resultados indican que la vía

extrínseca de apoptosis está involucrada en la muerte celular por los Sags bacterianos y virales.

Sin embargo, utilizando inhibidores de caspasa 9 y observando los niveles de despolarización de la membrana mitocondrial determinamos que la vía intrínseca también está involucrada. Por otra parte se detectó la presencia de Bid truncado. Bid ha sido recientemente involucrado en el entrecruzamiento entre la vía extrínseca y la mitocondrial. La activación de la caspasa 8 clivaría Bid -dando lugar a la presencia de Bid truncado- y este hecho induciría alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial lo que provocaría que ambas vías de apoptosis y el entrecruzamiento entre las mismas estuvieran involucradas en la muerte celular por los Sags.

El conjunto de estos resultados mostró entonces que el tratamiento de células de diferentes neoplasias murinas T con Sags que interactúan específicamente con cada uno de sus receptores T sufren muerte por apoptosis mediada tanto por la vía extrínseca como por la intrínseca existiendo además un entrecruzamiento entre ambas vías.

Finalmente investigamos el efecto de los Sags en la sobrevida de ratones inoculados con diferentes linfomas T. Determinamos que el tratamiento con Sags que interactúa específicamente con la cadena V $\beta$  de los TCR expresados por las células neoplásicas son capaces de aumentar significativamente la sobrevida de ratones inoculados con diferentes linfomas T sumamente agresivos. Por ej el tratamiento con SEB fue capaz de inducir un importante incremento en el tiempo de sobrevida de ratones inoculados con células de un linfoma que expresaba cadenas V $\beta$  reactivas a este Sag. Mientras que todos los ratones controles (sin tratar o tratados con Sags inespecíficos para ese linfoma) murieron en 3 semanas, el 40% de los ratones tratados con 2 úni-



cas dosis de SEB permanecieron libres de enfermedad al día 100, tiempo en el que se finalizó el estudio. La utilización de retrovirus MMTV que inducen la expresión de Sags en las células infectadas determinó sobrevividas libres de enfermedad de entre 70 a más del 90% de los ratones al día 200.

### ***Efecto de Superantígenos sobre células T neoplásicas humanas.***

Comenzamos a investigar si los Sags T son capaces de inducir la apoptosis de células neoplásicas T humanas. Utilizamos la línea Jurkat derivada de una leucemia aguda T pediátrica. Dichas células expresan en su receptor T la cadena V $\beta$ 8. Utilizamos las toxinas SEE y SEB derivadas de *Staphylococcus aureus*. SEE es un Sag que interactúa con la cadena V $\beta$ 8 en humanos y SEB se utilizó como control de especificidad ya que es un Sag que no interactúa con dicha región V $\beta$ . El cultivo de células Jurkat con SEE -en presencia de células presentadoras de antígeno THP1- indujo aumentos muy significativos en la apoptosis de las células Jurkat. La incubación con PBS o con SEB no alteró los niveles de apoptosis basales.

Mediante la medición de los niveles de expresión de Fas y Fas-L y el bloqueo de esta vía con Fas-Fc, determinamos que la vía del Fas-Fas-L (vía extrínseca) está involucrada en la apoptosis de células Jurkat mediada por SEE. Para determinar la participación de la vía intrínseca investigamos si SEE inducía alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial. En presencia de SEE las células Jurkat mostraron aumentos en el porcentaje de células que mostraban alteraciones en el potencial de la membrana mitocondrial. El tratamiento con SEB no indujo alteraciones en las mitocondrias. Estos resultados sugieren la participación de la vía intrínseca. Investigamos si existía entrecruzamiento entre ambas vías. La utilización de inhibidores de caspasa 8 y 9 y la detección

de Bid truncado sugirió que ambas vías intervienen y que están además interconectadas.

El conjunto de estos resultados indica que las células Jurkat son altamente sensibles a la inducción de apoptosis por Sags. Al igual que lo descripto en linfomas T murinos, la vía de Fas-Fas-L (extrínseca) y la vía intrínseca estarían involucradas en la apoptosis y existiría además un entrecruzamiento entre ambas vías.

### **Superantígenos B y Linfomas B.**

Aunque la capacidad de Sags B para inducir la apoptosis de células B normales se ha descripto para murinos y humanos, sus efectos sobre células B malignas no han sido aún explorados.

Utilizamos el Sag B PpL que interactúa con células B que expresan cadenas livianas  $\kappa$  en su receptor para investigar el efecto de este Sag en linfomas/leucemias murinas y humanas.

Superantígenos y linfomas/leucemias B murinos.

Utilizando leucemias/linfomas B murinos espontáneos y la línea celular A20 determinamos que PpL induce una disminución temprana en los niveles de expresión del BCR en aquellos que expresaban la cadena liviana  $\kappa$  pero no en los que expresaban la cadena liviana  $\lambda$ . El PpL también fue capaz de aumentar los niveles de expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 sólo en células B malignas portadoras de la cadena liviana  $\kappa$ . Estos resultados sugieren que la interacción entre PpL y linfomas B  $\kappa$  + induce su activación como se ha informado para células normales  $\kappa$  +. De importancia, PpL no aumentó los niveles proliferativos de las células B malignas.

En cuanto a las vías apoptóticas involucradas, como se informó para células normales, PpL fue capaz de alterar el potencial de membrana mitocondrial lo que sugiere que la vía intrínseca está involucrada en la apoptosis.



***Superantígenos y linfomas B humanos***

Investigamos si PpL era capaz de inducir apoptosis en células Daudi derivadas de un linfoma de Burkitt. Las células de esta línea celular expresan en su receptor la cadena liviana  $\kappa$ . PpL indujo la activación y posterior muerte por apoptosis de estas células.

Utilizamos esta línea celular para profundizar el estudio de los mecanismos de apoptosis involucrados. Se observó que el Sag inducía la despolarización de la membrana mitocondrial sugiriendo el involucramiento de la vía intrínseca. La inducción de apoptosis no se modificó en presencia de un inhibidor de caspasa-8. Tampoco se detectaron alteraciones en los niveles de expresión de Fas y Fas-L. El nivel de expresión de Bid no varió y no se detectó la presencia de la proteína Bid truncada. Estos datos sugieren que PpL no activa la vía extrínseca de apoptosis y actúa utilizando la vía intrínseca o vía apoptótica mitocondrial.

La vía mitocondrial está controlada por las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. Es de destacar que los linfomas de Burkitt poseen alteraciones en la proteína anti-apoptótica Bcl-2 que las protege de la muerte celular. Los miembros de la familia Bcl-2 se pueden dividir en tres clases en base a su homología de secuencia y función [32]. La primera clase comprende las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1 y Bcl-xl que contienen los cuatro dominios de homología Bcl-2 (BH1-4). Las proteínas de esta clase se unen y sequestran sus contrapartes pro-apoptóticas evitando así la apoptosis. La segunda clase incluye las proteínas pro-apoptóticas Puma, Bim, Bid, Bad, Bik, Noxa y Bmf, que contienen sólo el dominio BH3 (sólo BH3). La tercera clase incluye la proteína Bcl-2-x proteína asociada (Bax) y el antagonista de Bcl-2 o asesino (Bak) que presentan dominios BH1-3. Bax y Bak, cuando se activan, oligomerizan y causan la per-

meabilización de la membrana externa mitocondrial.

La participación de la vía intrínseca o mitocondrial en la apoptosis de células Daudi inducida por PpL de células B malignas fue confirmada por: la disminución de la apoptosis en presencia de un inhibidor de caspasa-9; los aumentos significativos de las proteínas Bim y Bax y la regulación negativa de Bcl-2, aumentando así la relación de expresión de Bax / Bcl-2; la translocación del citoplasma a las mitocondrias de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bim y su inhibición por el inhibidor de la caspasa-9 y por la translocación de la proteína Bcl-2 de la mitocondria al citosol y su inhibición por el inhibidor de la caspasa-9. Hemos detectado además una disminución significativa de los niveles de proteína Bcl-2 junto con la falta de alteraciones en los niveles de mRNA para esta proteína, lo que plantea la posibilidad de que las alteraciones inducidas por PpL incluirían aumentos en la degradación Bcl-2.

**DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran claramente que los Sags son capaces de inducir la apoptosis de neoplasias T y B de origen murino y humano actuando a través de sus receptores para el antígeno. Describimos además las vías de apoptosis involucradas. En el caso de linfomas T murinos hemos demostrado que el tratamiento de ratones con diferentes Sags aumenta muy significativamente la supervivencia libre de enfermedad.

Como hemos señalado, no existen reportes previos del efecto de los Sags actuando sobre los receptores para el antígeno en células neoplásicas linfoides.

La supuesta acción de Sags T sobre células humanas de leucemias/linfomas T ha sido sin embargo discutida. Se ha



reportado que las células leucémicas son capaces de proliferar *in vitro* frente a Sags bacterianos. Basados en estos datos se propuso que las infecciones bacterianas podría contribuir a la expansión de las células leucémicas en los pacientes o portadores. Es de notar que en estos experimentos no se evaluaron los niveles de apoptosis de estas células. También se hipotetizó que Sags bacterianos podrían estar involucrados en la expansión y evolución de linfomas T cutáneos, basándose en el uso restringido de células que expresan un determinado V $\beta$  en su receptor. Contrariamente, Vonderheid EC y col. hipotetizaron que la estimulación crónica de células T que migran a la piel por Sags estafilocócicos actuaría deplecionando esas células normales antes de que ocurra la transformación neoplásica y a consecuencia de esto se observaría una mayor frecuencia de células T neoplásicas que no se vean afectadas por los Sags estafilocócicos, negando así un rol de los Sags en la expansión de las células T neoplásicas.

No existen discusiones acerca de la supuesta acción de Sags B sobre neoplasias linfoides B.

Sería a nuestro entender de gran interés extender los resultados descriptos en este trabajo al estudio de neoplasias linfoides B y T humanas espontáneas utilizando modelos experimentales *in vivo* de modo de confirmar su susceptibilidad general a la inducción de apoptosis por diferentes Sags y de abrir la posibilidad de su uso como tratamiento.

Si fuera necesario utilizar Sags con efectos tóxicos, estos efectos deberían ser separados de su actividad superantigénica. En este sentido se ha demostrado por ejemplo que la carboximetilación de SEB bloquea sus propiedades enterotóxicas pero no su actividad superantigénica. Además muchos Sags codificados por retrovirus no están asociados con efectos tóxicos abriendo la

posibilidad de su uso en terapia génica. Por otra parte, tratamientos basados en la inoculación de células dendríticas antológicas transfectadas con RNAm codificante para Sags asociados a retrovirus MMTV evitaría los riesgos asociados a terapias génicas. Finalmente varios Sags han mostrado no poseer efectos tóxicos.

En conclusión, los resultados reportados a lo largo de este trabajo sugieren que los Sags podrían ser utilizados como una nueva herramienta terapéutica en neoplasias T and B que expresen receptores para el antígeno. La elección de los Sags a utilizar para el tratamiento sería personalizada para cada paciente, ya que implicaría la determinación de las regiones que expresa su receptor mediante técnicas sencillas y rápidas como por ejemplo la citometría de flujo (tipo de cadena liviana y pesada en el caso de células B y especificidad de las regiones V $\beta$  en el caso de neoplasias T). Pero sobre todo, tendría la ventaja de seleccionar sólo algunos clones T o B normales restringidos sin causar la muerte de otros tipos celulares.

#### AGRADECIMIENTOS

IP agradece a la Dra C. D. Pasqualini por la discusión de estos resultados. Pero por sobre todo agradece profundamente que haya sido la persona que la inició en las tareas de investigación y que le otorgó desde un principio la mayor libertad para la elección de los temas de trabajo desarrollados. Agradecemos además a los todos becarios e investigadores que han participado de este trabajo, especialmente a la Dra. Irene Nepomnaschy.

#### REFERENCIAS

1. Buggiano V, Goldman A, Nepomnaschy I, Bekinschtein P, Berguer P, et al. Characterization of two

- infectious mouse mammary tumor viruses: superantigenicity and tumorigenicity. *Scand J Immunol.* 1999;49:269–77.
2. Cabrera G, Vercelli C, Burzyn D, Badano N, Maglioco A, Costa H, Mundiñano J, Camicia G, Nepomnaschy I, Piazzon I. Increases in IgA(+) B cells in Peyer's patches during milk-borne mouse mammary tumor virus infection are influenced by Toll-like receptor 4 and are completely dependent on the superantigen response. *J Gen Virol.* 2010 Nov;91(Pt 11):2814–20.
3. Danial NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2007;13(24):7254–63.
4. Forsberg G, Ohlsson L, Brodin T, Björk P, Lando PA, et al. Therapy of human non-small-cell lung carcinoma using antibody targeting of a modified superantigen. *British J Cancer.* 2001;85(1):129–136.
5. Golovkina TV, Piazzon I, Nepomnaschy I, Buggiano V, Olano Vela M, et al. Generation of a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus by recombination between endogenous and exogenous viruses. *J Virol.* 1997;71(5):3895–3903.
6. Goodyear CS, Narita M, Silverman GJ. In vivo VL-targeted activation-induced apoptotic supraclonal deletion by a microbial B cell toxin. *J Immunol.* 2004;172(5):2870–7.
7. Goodyear CS, Corr M, Sugiyama F, Boyle DL, Silverman GJ. Cutting Edge: Bim is required for superantigen-mediated B cell death. *J Immunol.* 2007;178(5):2636–40.
8. Goodyear CS, Silverman GJ. Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a Staphylococcal Toxin. *J Exp Med.* 2003;197(9):1125–39.
9. Hockings C, Anwari K, Ninnis RL, Brouwer J, O'Hely M, Evangelista M, et al. Bid chimeras indicate that most BH3-only proteins can directly activate Bak and Bax, and show no preference for Bak versus Bax. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1735.
10. Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, et al. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 2009;36(3):487–99.
11. Lorenzo D, Duarte A, Mundiñano J, Berguer P, Nepomnaschy I, Piazzon I.
12. A B-Cell Superantigen Induces the Apoptosis of Murine and Human Malignant B Cells. *PLoS One.* 2016 Sep 7;11(9).
- 13.
14. Marrack P, Blackman M, Kuschner E, Kappler J. The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells. *J Exp Med.* 1990;171:455–464.
15. Mundiñano J, Berguer PM, Cabrera G, Lorenzo D, Nepomnaschy I, Piazzon I. Superantigens increase the survival of mice bearing T cell lymphomas by inducing apoptosis of neoplastic cells. *PloS one.* 2010;5(12):e15694.
16. Silverman GJ. B-cell superantigens. *Immunol Today.* 1997;18(8):379–86.
17. Silverman GJ, Goodyear CS. Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(6):465–75.
18. V Golovkina TV, Piazzon I, Nepomnaschy I, Buggiano V, de Olano Vela M, Ross SR. Generation of a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus by recombination between endogenous and exogenous viruses. *J Virol.* 1997 May; 71(5):3895–903.
19. Vonderheid EC, Boselli CM, Con-





roy M, Casaus L, Espinoza LC, et al. Evidence for restricted V $\beta$  usage in the leukemic phase of cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2005;124(3):651–61

## RESUMEN

Los superantígenos (Sags) son proteínas de origen bacteriano o viral capaces de estimular y causar la muerte de un alto número de linfocitos T o B. normales. Este hecho se debe a que – a diferencia de los antígenos convencionales que son reconocidos por todas las regiones variables del receptor de las células T (TCR) o B (BCR) – sólo interactúan con regiones constantes ubicadas dentro de las regiones variables de estos receptores. Los Sags B se unen a sitios constantes de las regiones variables de las cadenas pesadas o livianas de las inmunoglobulinas de superficie (BCR) y causan la muerte por apoptosis de las células B que los reconocen. Los Sags T se unen a los antígenos mayores de histocompatibilidad de clase II en las células presentadoras de antígenos e interactúan con linfocitos T que expresen una región variable particular de su cadena  $\alpha$ . Las células T reactivas mueren después de recibir esta fuerte estimulación.

No se conocen intentos de investigar si los Sags son capaces de inducir la muerte por apoptosis de células neoplásicas B o T. En el presente trabajo reportamos que diferentes Sags bacterianos o virales son capaces de inducir la apoptosis de células de leucemias/linfomas B y T murinos y humanos. Estudiamos los mecanismos de apoptosis involucrados. En el caso de los linfomas T estudiados encontramos que estaban implicadas tanto la vía extrínseca cuanto la intrínseca e incluso un entrecruzamiento de ambas vías. El tratamiento in vivo de ratones inoculados con diferentes linfomas T fue capaz de incrementar muy significativamente la sobrevida libre de

enfermedad. Mientras que el 100% de los ratones no tratados o tratados con un Sag control (no interactuante con el receptor T del linfoma) morían en pocos días, el tratamiento con Sags específicos indujo una sobrevida de entre el 40 al 90% de los mismos.

Se investigó la capacidad del Sag B PpL secretado por *Finkegoldia magna* y que interactúa con células B que expresan la cadena liviana  $\kappa$  para inducir la apoptosis *in vivo* e *in vitro*. de células de linfomas/leucemias B murinas y humanas  $\kappa$ +. El Sag utilizado indujo la apoptosis en estas células utilizando solo la vía intrínseca.

En resumen, se demostró que los Sags B y T inducen la muerte por apoptosis de células B y T neoplásicas que los reconocen a través de su receptor para el antígeno. Se discute la posibilidad del uso de los superantígenos para la implementación de una nueva herramienta terapéutica que tendría la ventaja de afectar solo un número discreto de linfocitos sin afectar otros tipos de células normales.

## SUMMARY

*Superantigens are mostly bacterial or viral proteins that stimulate a large number of normal T or B lymphocytes.. This fact is because – unlike conventional antigens that are recognized by all the variable regions of the receptor of these cells – they only interact with constant regions located within the variable regions of the receptors. B-cell superantigens bind to conserved sites of the VH or VL regions of immunoglobulin molecules outside their complementarity-determining regions causing the apoptosis of normal cognate B cells. T cell Superantigens bind to major histocompatibility complex class II molecules in antigen presenting cells and interact with T cells expressing a particular T cell receptor V $\beta$  inducing a strong proliferation/deletion response of the superantigen-reactive T cells. No attempts to investigate whether B or*



*T-cell Sags are able to induce the apoptosis of cognate malignant B or T cells were reported.*

*In the present study we show that bacterial and viral-encoded superantigens induce the apoptosis of murine and human cognate lymphoma T cells both in vitro and in vivo. The extrinsic and the intrinsic pathway of apoptosis were found to be involved. Besides, a cross-talk between both pathway was also found. In vivo exposure to bacterial superantigens was able to improve the survival of lymphoma bearing mice. Moreover, the permanent expression of a retroviral encoded superantigen induced the complete remission of an aggressive lymphoma in a high percentage of mice.*

*We also studied the ability of a B-cell superantigen (PpL) secreted by *Finnegoldia magna*, which interacts with  $\kappa^+$  bearing cells, to induce the apoptosis of murine and human  $\kappa^+$  lymphoma B cells both **in vitro** and **in vivo**. The involvement of the intrinsic but not the extrinsic pathway of apoptosis was clearly demonstrated.*

*In summary, herein we show that B and T superantigens are able to induce the apoptosis of cognate B and T malignant cells. The possibility of a therapeutic use of T and B Superantigens in lymphoma/leukemia B and T cells is discussed. Their possible use would have the advantage of delete only a discrete number of normal lymphocytes without altering other normal cell types.*